

Natürliche Bestandteile des Honigs: Hefen und deren Stoffwechselprodukte – Teil 4: Aus der Honigmatrix isolierte und identifizierte Hefespezies

G. Beckh, P. Wessel und C. Lüllmann

Institut für Honiganalytik, Flughafendamm 9A, D-29199 Bremen

Zusammenfassung

Die Matrix Honig ist nahezu unverderblich aufgrund der vorherrschenden Überlebensbedingungen für Mikroorganismen. Dennoch existieren eine Anzahl von Hefespezies, die befähigt sind, in dieser Matrix zu überleben – osmophile oder osmotolerante Arten – und den einzig bekannten Verderb von Honig verursachen. Im Rahmen dieser Untersuchung wurden folgende Gattungen über einen Projektzeitraum von zwei Jahren aus der Matrix Honig isoliert und identifiziert: *Zygosaccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Torulaspota*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula* und *Candida*. Erstgenannte Gattung wurde – sofern es möglich war – bis zur Art *Z. rouxii* bzw. *mellis* bestimmt. Von *Candida* wurden sechs, von *Cryptococcus* zwei Arten identifiziert, von den anderen wurde jeweils eine Art gefunden.

Summary

The matrix honey is nearly imperishable because of prevailing living conditions for microorganisms. Due to that fact an amount of yeast species are able to survive in this matrix – osmophilic or osmotolerant species – and cause the one known spoilage. The following genera were isolated and identified from the matrix honey during the two years project period: *Zygosaccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Torulaspota*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula* and *Candida*. From the first genus – if it was possible to name the species – one found *Z. rouxii* resp. *mellis*. *Candida* showed six, *Cryptococcus* two and the other genera one species each.

Keywords: Honig, Hefe, Wachstum, Spezies, osmophil / honey, yeast, growth, species, osmophilic

In Honig überlebensfähige Hefespezies

Wie bereits in Teil 1 der Reihe „Natürliche Bestandteile des Honigs – Hefen und deren Stoffwechselprodukte“ dargelegt¹⁾, sind eine Reihe von Hefespezies in der Lage, im Honig zu überleben. Wenn die Bedingungen es ermöglichen, kann es zur Vermehrung und unter Umständen auch Gärung im Honig kommen.

Die Fragestellung ist nicht neueren Ursprungs. In Veröffentlichungsdatenbanken²⁾ finden sich zu diesem Thema Arbeiten, die sich bereits zu Beginn bis Mitte des 20. Jahrhunderts mit osmophilen Organismen³⁾ oder speziell mit Hefen in fermentierendem Honig⁴⁻⁶⁾ beschäftigen. Die Komplexität der Problematik lässt sich anhand der im Laufe der Jahre veröffentlichten zahlreichen Hefespezies deutlich ablesen⁷⁻¹⁰⁾. Die Taxonomie der Hefen ist jedoch einem ständigen Prozess unterworfen, so dass ein Erfassen des Spektrums der in Honig vorkommenden Hefespezies – vor allem auch

vor dem Hintergrund der Gärungsproblematik bei Import-honig – nötig schien.

Um eine fundierte Grenzwertdiskussion zu führen, ist es unerlässlich, diese Arten ansprechen und beurteilen zu können. Anhand von 62 Importhonigproben aus Rohwarenmustern wurde auf den Hefegehalt und die vorhandenen Hefearten untersucht. Die Ergebnisse wurden im Rahmen eines Projekts ermittelt. Dieses Vorhaben wurde aus Mitteln der industriellen Gemeinschaftsforschung (Bundesministerium für Wirtschaft und Arbeit/AiF) über den Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI) gefördert. Projekt-Nr.: AiF-FV 12521 BG.

Ermittlung der in Honig vorkommenden Hefespezies

Die Anreicherung der osmotoleranten Hefen von 18 Honigmustern erfolgte mit 10 g Honig und 90 ml 50 %ige Glucose-Bouillon nach Homogenisierung im Stomacher für eine Minute.

Die Hefe-Koloniezahl wurde anhand eines Spatelausstrichs auf einer Würze-Agar-Gussplatte (Bierwürze aus Brauerei, nicht standardisiert) nach fünf Tagen Bebrütung bei 26 °C ermittelt.

Weitere 36 Proben wurden wie folgt behandelt: Die Anreicherung der Hefen aus 10 g Honig erfolgte wiederum mit 90 ml 50 %iger Glucose-Bouillon. Dem MPN-Verfahren (MPN = Most Probable Number) entsprechend (siehe auch Baumgart¹¹⁾) wurde in drei verschiedenen Verdünnungen im Dreifachansatz die Hefezellzahl bestimmt. Die Identifizierung der Hefen erfolgte auf Sabouraud-Agar (D(+)-Glucose 40,0 g, Kaseinpepton 5,0 g, Fleischpepton 5,0 g, Agar 15,0 g pro Liter, eventuell Zusatz von Benzylpenicillin-Tetracyclin-Gemisch oder Chloramphenicol als Antibiotikum, pH-Wert 5,6 ± 0,2) unter Zuhilfenahme biochemischer Differenzierung.

Weitere 13 Proben wurden direkt oder nach Verdünnung ausplattiert. Direktes Ausplattieren: Die Honigproben wurden direkt auf Dichloran 18 % Glycerolagar-Medium mit Chloramphenicol (DG18) sowie Malzextrakt-Agar mit 50 % Glucose (MEA 50G) ausplattiert. Ausplattieren nach Verdünnung: Reihenverdünnungen wurden mit sterilem Wasser von 10⁻¹ bis 10⁻³ vorgenommen. Von jeder Verdünnung wurden 0,1 ml auf DG18- und MEA 50G-Medium ausplattiert. Alle Platten wurden für eine Woche bei 24 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die verschie-

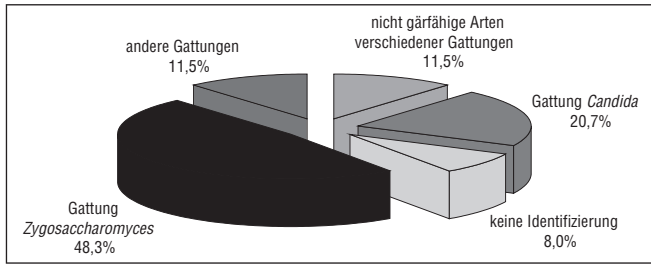


Abb. 1 Die Häufigkeit der identifizierten Gattungen aus 87 Probehonigen

denen entwickelten Hefespezies auf DG18-Agar isoliert und bis zur Artbestimmung bei 24 °C im Dunkeln bebrütet.

Im Importhonig identifizierten Hefespezies

Über den gesamten Projektzeitraum wurden Honige, die entweder mikroskopisch oder sensorisch auffällig waren bzw. aus Ländern mit bekannter Gärungsproblematik stammten, mikrobiologisch auf Hefen untersucht und anschließend die Hefen identifiziert. Es handelte sich um Rohwaren direkt aus den Erzeugerländern oder Rohwaren, wie sie in Deutschland als Fassrohware geliefert werden sowie einige Kaufmuster. Im Rahmen dieser Identifikation wurden 8 verschiedene Gattungen ermittelt: *Zygosaccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Torulaspora*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula* und *Candida*. Erstgenannte Gattung wurde – sofern es möglich war – bis zur Art *Z. rouxii* bzw. *mellis* bestimmt. Von *Candida* wurden die Arten *C. glabrata*, *holmii*, *lusitaniae*, *magnoliae*, *parapsilosis* und *rugosa*, von *Cryptococcus* die Arten *C. albidus* und *laurentii* identifiziert, des weiteren *Schizosaccharomyces octosporus*, *Debaryomyces hansenii*, *Pichia guilliermondii*, *Torulaspora delbrueckii* und *Rhodotorula mucilaginosa* (siehe Tabellen 1 und 2).

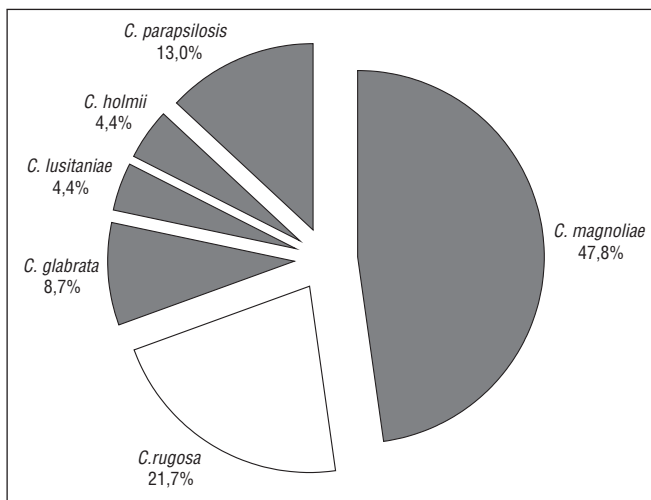


Abb. 3 Die Aufteilung der identifizierten *Candida*-Isolate in Arten (nicht gärfähige ohne Schraffur)

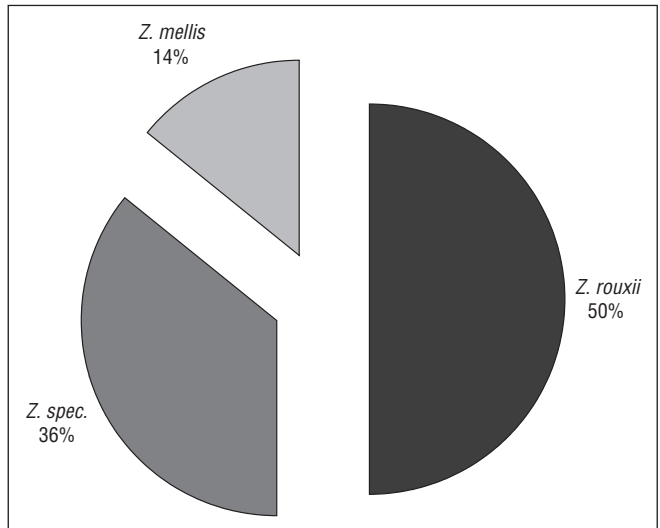


Abb. 2 Die Aufteilung der identifizierten *Zygosaccharomyces*-Isolate in Arten (sofern Artbestimmung möglich war)

Tabelle 1 zeigt alle ermittelten Parameter der zur Hefeidentifikation herangezogenen Honigproben.

Die Verteilung der in Tabelle 1 dargestellten Gattungen der 62 untersuchten Proben gestaltet sich wie aus Abbildung 1 folgt.

Die beiden am häufigsten gefundenen Gattungen sind *Zygosaccharomyces* und *Candida*. Hierbei konnten folgende Arten – soweit möglich – ermittelt werden: siehe Abbildungen 2 und 3.

Alle weiteren ermittelten Arten finden sich im Diagramm der Abbildung 4.

Für den Honigverderb relevante Hefespezies

Alle im Rahmen der Untersuchungen identifizierten Hefen sind in der Literatur beschrieben worden. Einige von ihnen sind mit Pollen, Nektar, Bienen oder Honig in Verbindung gebracht worden, andere hingegen als omnipotente oder spezialisierte Verunreinigungshefe bekannt.

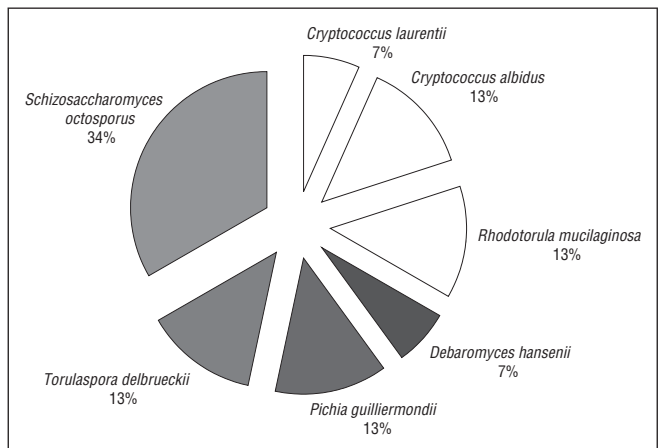


Abb. 4 Die Aufteilung der weiteren identifizierten Isolate (nicht gärfähige ohne Schraffur)

Tab.1 Über den Projektzeitraum identifizierten Hefen aus Probehonigen (fett: nicht gärfähige Arten)

Herkunft	Wassergehalt [%/aw-Wert]	Zustandsbeschreibung	Identifikation der isolierten Hefestämme	Zellzahl/g mikroskopisch
Asien				
China	21,5/0,65	direkt vom Imker 2000	<i>Zygosaccharomyces mellis</i> <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> <i>Candida rugosa</i>	0,4 x 10 ⁶
China	21,5/0,66	dir. aus Bienenstock 2000	<i>Zygosaccharomyces mellis</i> <i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	6,12 x 10 ⁶
China	17,4/0,61	Fassrohware 2000	<i>Candida rugosa</i>	0,3 x 10 ⁶
China	n.b.	direkt vom Imker Originalfutterwabe 2002	<i>Candida glabrata</i>	0,2 x 10 ⁶
China white	17,3/0,60	Fassrohware 2000	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	0,93 x 10 ⁶
China white	16,1/0,61	Fassrohware 2001 Glyceringehalt 590 mg/kg	<i>Zygosaccharomyces spec.</i>	24,8 x 10 ⁶
China 1a	16,9/0,60	Fassrohware 2000	<i>Debaryomyces hansenii</i>	1,01 x 10 ⁶
China Blüte	19,0/n.b.	direkt vom Imker 2002	<i>Candida glabrata</i> <i>Candida magnoliae</i>	n.b.
China Akazie	19,7/0,61	organic Nanjing 2000	keine Hefe identifiziert	0,25 x 10 ⁶
China Akazie	16,2/0,58	Fassrohware 2000	a) <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> b) <i>Schizosaccharomyces octosporus</i>	0,72 x 10 ⁶
China Linde	18,5/n.b.	Originalglas: Hefen mikroskopisch gering 2000	keine Hefe identifiziert	n.b.
China Linde	18,9/0,63	direkt vom Imker 2000	<i>Candida magnoliae</i>	0,04 x 10 ⁶
China Raps	21,4/0,67	direkt vom Imker 2000	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	0,02 x 10 ⁶
China Sonnenblume	24,0/n.b.	direkt vom Imker 2001	<i>Candida magnoliae</i>	n.b.
China Melone	n.b.	Hefen mikroskopisch und mikrobiol. erhöht Rohware 2001 direkt aus China unprocessed	<i>Zygosaccharomyces spec.</i>	n.b.
China Buchweizen	17,1/0,61	Fassrohware 2000	keine Hefe identifiziert	0,11 x 10 ⁶
Vietnam	20,2/0,63	Fassrohware 2000	<i>Zygosaccharomyces mellis</i> <i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	0,22 x 10 ⁶
Vietnam	17,5/0,61	Fassrohware 2000	a)+b) <i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	0,42 x 10 ⁶
Vietnam	18,7/0,62	Fassrohware 2000	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	0,4 x 10 ⁶
Vietnam, Kaffee	19,3/0,62	Fassrohware 2002 Glyceringehalt 1530 mg/kg Hefen mikroskopisch stark erhöht	<i>Pichia guilliermondii</i> <i>Candida parapsilosis</i>	1,12 x 10 ⁶
Indien	n.b.	Fassrohware, gärig 2000	<i>Candida rugosa</i> <i>Zygosaccharomyces spec.</i>	n.b.
Indien Bio	19,5/0,63	Fassrohware 2001 Glyceringehalt 1750 mg/kg	<i>Zygosaccharomyces spec.</i> <i>Aspergillus spec.</i>	12,23 x 10 ⁶
Indien Raps	n.b.	Fassrohware, gärig 2000	a)+b) <i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	n.b.
Indien Raps	n.b.	Fassrohware, gärig 2000	a)+b) <i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	n.b.
Mittel- und Südamerika				
Mexico	n.b.	Rohware direkt aus Mexico 2000	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	n.b.
Mexico	n.b.	Rohware direkt aus Mexico 2000	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> <i>Torulaspora delbrueckii</i>	n.b.
Mexico	17,4/0,57	Rohware direkt aus Mexico 2000	keine Hefe identifiziert	0,04 x 10 ⁶
Mexico	18,2/0,59	Rohware direkt aus Mexico 2000	<i>Zygosaccharomyces mellis</i> <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> <i>Schizosaccharomyces octosporus</i>	0,1 x 10 ⁶
Mexico Yucatan	21,2/0,64	Fassrohware 2000	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	0,86 x 10 ⁶
Mexico Yucatan	18,2/0,62	Fassrohware 2001, Glyceringehalt 200 mg/kg	<i>Zygosaccharomyces spec.</i>	0,35 x 10 ⁶
Argentinien	19,4/0,62	Rohware direkt aus Argentinien 2000	a)+b) <i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	0,26 x 10 ⁶
Argentinien	n.b.	Fassrohware 2001, Hefen mikroskopisch und mikrobiol. erhöht	<i>Cryptococcus albidus</i>	n.b.
Argentinien	17,2/0,60	Fassrohware 2001, Hefen erhöht, Geschmack säuerlich	<i>Zygosaccharomyces spec.</i>	0,79 x 10 ⁶

Tab. 1 Über den Projektzeitraum identifizierten Hefen aus Probehonigen (fett: nicht gärfähige Arten) (continued)

Herkunft	Wassergehalt [%/aw-Wert]	Zustandsbeschreibung	Identifikation der isolierten Hefestämmen	Zellzahl/g mikroskopisch
Brasilien Brasilien, Blüte	n.b.	Fassrohware 2002, Ethanolwert 482 mg/kg, Glycerinwert 280 mg/kg, Hefen erhöht, Geschmack leicht gärig	<i>Candida parapsilosis</i> <i>Pichia guilliermondii</i>	6,3 x 10 ⁶
Guatemala	20,0/n.b.	Fassrohware 2002, Ethanolwert 250 mg/kg, Glycerinwert 290 mg/kg, Hefen erhöht	<i>Candida lusitanae</i> <i>Zygosaccharomyces spec.</i>	0,64 x 10 ⁶
Guatemala	20,5/0,63	Fassrohware 2000	a)+b) <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> <i>Zygosaccharomyces mellis</i>	0,74 x 10 ⁶
Cuba	17,7/0,62	Fassrohware 2000	<i>Candida rugosa</i>	0,56 x 10 ⁶
Cuba	17,6/0,59	Rohware direkt aus Cuba 2000	a) <i>Schizosaccharomyces octosporus</i> b) <i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	0,1 x 10 ⁶
Salvador	n.b.	Rohware direkt aus Cuba 2000	<i>Zygosaccharomyces mellis</i> <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> <i>Schizosaccharomyces octosporus</i> <i>Torulaspota delbrueckii</i>	0,05 x 10 ⁶
Salador	n.b.	mit Wabe 2000	<i>Schizosaccharomyces octosporus</i>	n.b.
Südamerika, Wald	n.b.	Faßrohware 2000	<i>Candida rugosa</i>	n.b.
USA	n.b.	Rohware Kaufmuster 2001, Hefen mikroskopisch stark erhöht	<i>Zygosaccharomyces spec.</i>	n.b.
Europa				
Deutschland	n.b.	Faßrohware, gärig 2000	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	n.b.
Deutschland	n.b.	Faßrohware, gärig 2000	keine Hefe identifiziert	n.b.
Deutschland, Raps	n.b.	Fassrohwaren 2001, Hefen mikroskopisch stark erhöht	<i>Cryptococcus albidus</i> <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	n.b.
Deutschland Weißtanne	n.b.	Fassrohware, gärig 2000 Hefen erhöht	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	n.b.
Frankreich Provence	17,5/n.b.	Fassrohware 2002, Hefen mikroskopisch stark erhöht	<i>Candida magnoliae</i>	n.b.
Frankreich Sonnenblume	n.b.	Fassrohware 2001, Hefen mikroskopisch erhöht	<i>Candida magnoliae</i>	n.b.
Frankreich Raps	n.b.	Fassrohware 2002, Hefen mikroskopisch stark erhöht	<i>Zygosaccharomyces spec.</i> <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	n.b.
osteurop. Linde	17,7/0,57	Probehonig für Versuche 2000	keine Hefe identifiziert	0,03 x 10 ⁶
osteurop. Akazie	18,7/0,57	Probehonig für Versuche 2000	keine Hefe identifiziert	0,01 x 10 ⁶
Ungarn Akazie	n.b.	Fertigware mit Wabe 2001, Hefen erhöht	<i>Candida holmii</i> , <i>Candida magnoliae</i>	n.b.
Rumänien, Blüte	n.b.	Fassrohware 2002, Hefen mikroskopisch stark erhöht	<i>Cryptococcus laurentii</i> <i>Zygosaccharomyces spec.</i>	n.b.
Tschechien, Tanne	18,8/n.b.	Fassrohware 2002, mikroskopisch ungewöhnlich stark erhöht	<i>Candida parapsilosis</i> <i>Zygosaccharomyces spec.</i>	n.b.
Italien Wald	15,8/n.b.	Fassrohware 2001, Hefen mikroskopisch erhöht	<i>Candida magnoliae</i>	n.b.
Türkei Sonnenblume	18,2/0,62	Rohware Kaufmuster 2001, Hefen mikroskopisch erhöht	<i>Zygosaccharomyces spec.</i> <i>Candida magnoliae</i>	0,09 x 10 ⁶
Australien und Neuseeland				
Australien	15,8/0,57	Fassrohware 2000	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	0,05 x 10 ⁶
Australien 1a	n.b.	Fassrohware 2001, Hefen mikroskopisch und mikrobiol. erhöht	<i>Candida magnoliae</i>	n.b.
Neuseeland Blüte	n.b.	Fassrohware 2002, Hefen mikroskopisch ungewöhnlich stark erhöht	<i>Zygosaccharomyces spec.</i>	n.b.
Neuseeland Wald	16,5/n.b.	Fassrohware 2001, Hefen mikroskopisch erhöht	<i>Candida magnoliae</i>	n.b.
Neuseeland Klee	n.b.	Fassrohware 2001, Hefen mikroskopisch erhöht	<i>Zygosaccharomyces spec.</i>	n.b.
Neuseeland Klee	n.b.	Fassrohware 2001, Hefen mikroskopisch erhöht	<i>Zygosaccharomyces spec.</i> <i>Candida magnoliae</i>	n.b.

n.b.: nicht bestimmt

Tab. 2 Über den Projektzeitraum identifizierte Hefen (Charakterisierung nach Barnett et al.¹²⁾ und Walker¹³⁾)

Art	Charakter	Gärfähigkeit/Substrat	Assimilation von
<i>Candida rugosa</i>	Verunreinigungshefe	nicht gärfähig	verschiedenen Medien, u.a. Glycerin und Ethanol
<i>Cryptococcus laurentii</i>	auf zahlreichen Substraten, z.B. Trauben	nicht gärfähig	zahlreichen Medien, u.a. Glycerin und Ethanol
<i>Cryptococcus albidus</i>	auf zahlreichen Substraten z.B. Wein, gefunden auch bei Hummeln	nicht gärfähig	zahlreichen Medien, u.a. Glycerin und Ethanol
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	auf zahlreichen Substraten z.B. Süßem, aber auch fermentierendem Tabak	nicht gärfähig	zahlreichen Medien, u.a. Glycerin und Ethanol
<i>Candida glabrata</i>	Vorkommen: verschiedene (gärende) Fruchtsäfte, in Bäckerhefe	gärfähig; Glucose, Trehalose	Glucose, Trehalose u. a., auch Glycerin und Ethanol
<i>Candida holmii</i>	asexueller Status von <i>Saccharomyces exiguus</i>	gärfähig; Glucose, Saccharose, Trehalose u.a.	zahlreichen Medien, u.a. Glycerin und Ethanol
<i>Candida lusitaniae</i>	asexueller Status von <i>Clavispora lusitaniae</i>	gärfähig; Glucose, z.T. Maltose, Saccharose, Trehalose u.a.	zahlreichen Medien, u.a. Glycerin und Ethanol
<i>Candida magnoliae</i>	mit Bienen assoziiert; Wachstum auf 60%iger Glucoselösung ist nachgewiesen	gärfähig (z. T. zeitverzögert); Glucose, Saccharose und Trehalose	verschiedenen Medien, u.a. Glycerin und Ethanol
<i>Candida parapsilosis</i>	diverse Vorkommen	gärfähig; Glucose	zahlreichen Medien, u.a. Glycerin und Ethanol
<i>Debaryomyces hansenii</i>	auf zahlreichen Substraten als Verunreinigung, hitzetolerant	gärfähig; Glucose und Saccharose	zahlreichen Medien, u.a. Glycerin und Ethanol
<i>Pichia guilliermondii</i>	auf zahlreichen Substraten, z.B. Traubensaft	gärfähig; Glucose und Saccharose	zahlreichen Medien, u.a. Glycerin und Ethanol
<i>Schizosaccharomyces octosporus</i> *	osmotolerante Hefe; Wachstum auf 60%iger Glucoselösung ist nachgewiesen	gärfähig; Glucose und Maltose	Glucose, Maltose, stärkehaltigen Medien
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	auf zahlreichen Substraten, z.B. gärriger Traubensaft	gärfähig; Glucose, z.T. Maltose, Saccharose, Trehalose u.a.	zahlreichen Medien, u.a. Glycerin und Ethanol
<i>Zygosaccharomyces mellis</i>	Vorkommen: süße Nahrungsmittel, auch in Honig	gärfähig; Glucose und Maltose	zahlreichen Medien, u.a. Glycerin und Ethanol
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> **	Vorkommen: süße Nahrungsmittel, auch in Honig, hitzetolerant	gärfähig; Glucose, Maltose, Saccharose, Trehalose, z.T. zeitl. verzögert	links genannte Saccharide sowie Glycerin und Ethanol

*Im Identifikationsansatz von Prof. Stahl, Berlin – im Rahmen des Projekts – assimilierte diese Hefe auch Saccharose, Glycerin und weitere Substrate; **Gro-leau et al.¹⁴⁾ fanden hohe Produktionsraten an Glycerin. In den von Prof. Stahl, Berlin im Rahmen des Projekts untersuchten Identifikationsansätzen waren die Fermentations- bzw. Assimilationsprodukte nicht bei allen 21 Stämmen gleich

Im Folgenden eine Charakterisierung der identifizierten Hefen (siehe Tab. 2).

Der osmophile Charakter von *Debaryomyces hansenii* wurde bereits von Zimmerli¹⁵⁾ beschrieben. Als mit Bienen assoziiert findet man *Candida magnoliae*¹²⁾, mit Nektar und/oder Pollen vorkommend werden *Cryptococcus albidus* und *laurentii*, *Rhodotorula mucilaginosa* sowie *Candida parapsilosis* erwähnt¹⁶⁾. In Verbindung mit Honig sowie dessen Verderbnis wurden *Zygosaccharomyces rouxii* und *mellis* sowie *Schizosaccharomyces octosporus* mehrfach aufgeführt^{8,9,12,17)}. In süßen Getränken/Säften wurden *Torulaspora delbrueckii*¹⁸⁾ sowie *Candida glabrata* und *holmii* nachgewiesen, die beiden letztgenannten findet man auch auf bereits fermentierenden Substraten. *Candida rugosa* ist eine typische Verunreinigungshefe, die in Faeces aber beispielsweise auch in Sake-Starterhefe zu finden ist. Auch *Pichia guilliermondii* kommt als Verunreinigung sowie u.a.

im menschlichen Sputum vor, ein weiteres Humanpathogen ist *Candida lusitaniae*¹⁹⁾.

Der Eintrag der Hefen findet also entweder während des natürlichen Prozesses oder aber durch den anthropogenen Einfluss – z.B. Hygiene während der Ernte, Lagerung etc. – statt.

Unter Versuchsbedingungen hatten *Zygosaccharomyces rouxii* sowie *Schizosaccharomyces octosporus* auf die Verderbnis des Honigs den höchsten Einfluss. Viele der mit Pollen und Nektar oder Bienen assoziierten Arten werden den Überlebensbedingungen im Honig unter osmotischen Druck nicht standhalten können, so dass es eine Sukzession in der Besiedelungsabfolge gibt (siehe auch Gilliam¹⁶⁾ sowie Battcock und Azam-Ali²⁰⁾). Vermutlich ist es deshalb aus der Fülle der in Zusammenhang mit Honig und seinem Verderbnis genannten Arten nur wenigen möglich, tatsächlich zur Verderbnis desselben zu führen (vergleiche auch Schneider⁹⁾).

Alle im Rahmen dieser Untersuchung analysierten Proben zeigten im mikroskopischen Bild Hefen – von sieben Proben konnten allerdings keine Isolate hergestellt und identifiziert werden. Die Zellzahl dieser Proben betrug maximal 250000 Hefen pro g Honig. Drei dieser sieben Proben waren diejenigen mit den niedrigsten Wasseraktivitäten.

Es konnte keine Sortenspezifität resp. -präferenz aller identifizierten Hefen auf bestimmte Honige festgestellt werden – so fand sich zwar in drei der vier untersuchten Sonnenblumenhonige *Candida magnoliae*, diese Hefe kam aber auch in Akazien-, Klee-, Linden- und Blütenhonigen vor. Bezüglich der botanischen Herkunft fermentierter Honige fand auch *Schneider*⁹⁾ keine Unterschiede.

Die geografische Herkunft hingegen könnte u.U. für das Auftreten bestimmter Arten eher eine Rolle spielen. *Schneider*⁹⁾ ermittelte in seiner Arbeit ausschließlich *Zygosaccharomyces rouxii* als Verursacher der Gärung, und zwar bei zwei Honigen aus Deutschland, einem aus der Dominikanischen Republik und einem balinesischer Herkunft. Die hier vorgelegte Untersuchung zeigt eine weltweite Verbreitung dieser Art.

Asiatische Honige zeigen oftmals ein etwas anderes Spektrum an vorkommenden Hefen^{21,22}. *Schizosaccharomyces octosporus* kam in der vorliegenden Studie anteilig öfter in Honigen aus Mittel- und Südamerika vor.

In fast allen als gärig und/oder mikroskopisch eine erhöhten Hefegehalt aufweisenden Proben fanden sich *Zygosaccharomyces spec.*, *rouxii* und *mellis* sowie *Candida magnoliae* oder *parapsilosis*.

Wie bereits in Teil 3 der Reihe „Natürliche Bestandteile des Honigs – Hefen und deren Stoffwechselprodukte“ erläutert²³, verfügen bestimmte Hefearten z.B. *Zygosaccharomyces rouxii* oder *Debaryomyces hansenii* offensichtlich über einen speziellen Regulationsmechanismus, der es bei osmotischem Stress erlaubt, aktiv Glycerin als osmotisch regulierende Substanz abzugeben bzw. aufzunehmen, den so genannten HOG pathway (high osmolarity glycerol pathway).

Dieser HOG pathway ist eine Strategie der Hefen, Stress – entstanden durch osmotischen Druck – zu bewältigen. Wegen dieser Eigenschaft, osmotischen Stress zu ertragen, können *Zygosaccharomyces rouxii* oder *Debaryomyces hansenii* auch in stark salzhaltigen Milieus überleben^{24,25} – ihr Regulationsmechanismus zur Anpassung an den osmotischen Stress erlaubt ihnen, sich unter eher überlebensfeindlichen Umständen ökologische Nischen zu schaffen.

Zygosaccharomyces spec., *rouxii* und *mellis*, *Candida magnoliae* und *parapsilosis*, *Schizosaccharomyces octosporus* sowie *Debaryomyces hansenii* kommen in über 70 % der Fälle in der Honigmatrix vor und scheinen somit die Hauptverursacher von Honiggärung zu sein, wobei die Gattung *Zygosaccharomyces* im Hinblick auf seine Nachweisbarkeit in fast der Hälfte der untersuchten Proben herausragt.

Bezüglich der Gärungsproblematik in Honigen ist von der Hefeauszählung als alleiniger Parameter mit Grenzwerten,

die zur Ablehnung des Honigs führt aufgrund falsch positiver Ergebnisse abzuraten – so wären z.B. der in Tabelle 1 aufgeführte deutsche Rapshonig oder Argentinhonig abgelehnt worden, obgleich die Artbestimmung zeigt, dass lediglich nicht gärfähige Arten vertreten sind.

Neben der Möglichkeit, geeigneter Parameter zur Abschätzung der vorausgegangenen und/oder abgestoppten Gärung zu finden (vgl. *Timmroth* und *Speer*²⁶⁾) wäre ein weiterer Ansatz zur Präzisierung der vorliegenden Problematik das Erstellen und Ermitteln genetischer Fingerprints der Hauptverursacher, die nicht nur Verderbnis hervorrufen sondern auch großen ökonomischen Schaden verursachen²⁷⁾.

Literatur

- 1) *Beckh, G.* und *C. Lüllmann*: Natürliche Bestandteile des Honigs: Hefe und deren Stoffwechselprodukte – Teil 1: Hefegehalt. Deut. Lebensm.-Rundsch. **95**, 457–463 (1999).
- 2) Internetdatenbank: www.sci.fvl-apither\medbase\micr-hone.html.
- 3) *Richter, A. A.*: Über einen osmophilen Organismus, den Hefepilz *Z. mellis acidii* ssp. Mykol. Zentralbl. **1** (3/4), 67–76 (1912).
- 4) *Marvin, G. E.*: The occurrence and characteristics of certain yeasts found in fermented honey. J. Econ. Entomol. **21** (2), 363–370 (1928).
- 5) *Lochhead, A. G.* and *D. A. Heron*: Microbiological studies of honey: I: Honey fermentation and its causes; II: Infection of honey by sugar-tolerant yeasts. Can. Dept. Agric. Bull. **114**, 1–47 (1929).
- 6) *Lochhead, A. G.* and *Farrel*: The types of osmophilic yeasts found in normal honey and their relation to fermentation. Can. J. Res. **5**, 665–672 (1931).
- 7) *Batra, L. R.*, *S. W. T. Batra* and *G. E. Bohart*: The mycoflora of domesticated and wild bees (Apoidea). Mycopathol. Mycol. Appl. **49**, 13–44 (1973).
- 8) *Kumbhojkar, M. S.*: *Saccharomyces lochheadii* Kumbhojkar: a new species of osmophilic yeast from Indian honey sample. Biovigyanam **4** (2), 169–171 (1978).
- 9) *Schneider, A.*: Zum Vorkommen osmophiler Hefen in Honigen. Diplomarbeit, Institut für Lebensmitteltechnologie, Universität Hohenheim (1995).
- 10) *Schröder, A.*: Charakterisierung der Fermentation von Honig (Honigverderb) anhand chemischer, physikalischer, mikrobiologischer und sensorischer Parameter. Dissertation an der Fakultät I der Universität Hohenheim (2002), zgl. Logos Verlag Berlin.
- 11) *Baumgart, J.*: Mikrobiologische Untersuchung. Behrs Verlag, Hamburg (2000).
- 12) *Barnett, J. A.*, *R. W. Payne* and *D. Yarrow*: Yeasts characteristics and identification. 3. Aufl., Cambridge University Press, Cambridge (2000).
- 13) *Walker, G. M.*: Yeast – Physiology and Biotechnology. John Wiley & Sons, Chichester (1998).
- 14) *Groleau, D.*, *P. Chevalier* and *T. L. S. Tse Hsing Yuen*: Production of polyols and ethanol by the osmophilic yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. Biotechnol Lett. **17** (3), 315–320 (1995).
- 15) *Zimmerli, A.*: Osmotolerante Hefen in Lebensmitteln. Chem. Rundschau **30**, 15–23 (1977).
- 16) *Gilliam, M.*: Microbiology of pollen and bee bread: the yeasts. Apidologie **10** (1), 43–53 (1979).
- 17) *Jimenez, M.*, *J. J. Mateo*, *T. Huerta* and *R. Mateo*: Influence of the storage conditions on some physicochemical and mycological parameters of honey. J. Sci. Food Agr. **64**, 67–74 (1994).
- 18) *Jährig, A.* und *W. Schade*: Mikrobiologie der Gärungs- und Getränkeindustrie. CENA Verlag (1993).
- 19) Centralbureau voor Schimmelcultures-Datenbank: Beschreibung der Species. www.cbs.knaw.nl.

- 20) *Battcock, M.* and *S. Azam-Ali*: Fermented fruits and vegetables. A global perspective. FAO Agricultural Services Bulletin No. 134 Rome, Italy (1998).
- 21) *Furuta, T.* and *Y. Okimoto*: Study on yeasts in honey. Bull. Fac. Agr. **15**, 37–43 (1975).
- 22) *Furuta, T.* and *Y. Okimoto*: Further investigations on honey yeasts. Bull. Fac. Agr. **18**, 32–38 (1978).
- 23) *Beckh, G., P. Wessel* und *C. Lüllmann*: Natürliche Bestandteile des Honigs: Hefen und deren Stoffwechselprodukte – Teil 3: Der Ethanol- und der Glyceringehalt als Qualitätsparameter mit Bezug zum Hefewachstum. Deut. Lebensm.-Rundsch. **101**, 1–6 (2005).
- 24) *Blomberg, A.*: Osmoregulation and osmotolerance in yeast. Dissertation Department of Marine Microbiology University of Göteborg, Sweden (1988).
- 25) *Schoondermark-Stolk, S., J. Boonstra, A. J. Verkleij* and *C. T. Verrips*: Identifying *Zygosaccharomyces rouxii* genes by the use of DNA microarrays. Poster Meeting of the Benelux Yeast Research Groups, Leuven, Belgium (2001).
- 26) *Timmroth, R.* und *K. Speer*: Development of analytical indicator substances for honeys strongly contaminated with yeasts. Proceedings **1**, 142–145 sowie Vortrag EURO FOOD CHEM XII, 24–26. September 03, Brügge, Belgien (2003).
- 27) *Esteve-Zarzoso, B., C. Belloch, F. Uruburu* and *A. Querol*: Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. Int. J. Syst. Bact. **49**, 329–337 (1999).
-